

【物件名】

資料5

資料5

【添付書類】

19



111

(19) 日本国特許庁 (J.P.)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-84075

(43) 公開日 平成5年(1993)4月6日

(51) Int. Cl. ⁴	特許庁番号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C12N 9/10		7623-4B		
A01H 5/00		A 8602-2B		
C07K 15/10	ZNA	7731-4H		
		7236-4B	C12N 5/00	C
		8828-4B	15/00	A
審査請求 未請求 請求項の数23(全19頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平3-328331

(22) 出願日 平成3年(1991)11月13日

(31) 優先権主張番号 613189

(32) 優先日 1990年11月14日

(33) 優先権主張国 米国 (U.S.)

(71) 出願人 591116001

フィリップ・モーリス・プロダクツ・イン
コーポレイテッドPHILIP MORRIS PRODU
CTS INCORPORATEDアメリカ合衆国ヴァージニア州23234、リ
フチモンド、コマース、ロード 3801

(72) 発明者 ハーバート・ワイ・チカタニ

アメリカ合衆国ヴァージニア州23112、ミ
ドロシアン、バーンズ、スプリングス、ロ
ード 1381B

(74) 代理人 弁理士 安達 光雄 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ブトレフシンN-メチルトランスフェラーゼ、ブトレフシンN-メチルトランスフェラーゼをコードする組換えDNA分子、およびニコチン含量が変化したトランスジェニックタバコ植物

(57) 【要約】 (修正有)

【目的】 この発明は、高度に精製されたタバコブトレフシンN-メチルトランスフェラーゼ (PMT)、その精製法、およびPMT DNA配列の製造法を提供するものである。

【構成】 精製法は、タバコ植物抽出液をアニオン交換媒体に添加する工程を有し、添加温度および抽出液のpHと組成は、PMTがアニオン交換媒体によって保持されるような条件である。次にPMTを、有効量のポリアミンを含有する稀緩衝液で、アニオン交換媒体から洗脱する。またPMTをコードするセンス組換えDNA分子とアンチセンス組換えDNA分子、これらの組換えDNA分子を含有するベクター、およびこれらのDNA分子またはベクターで形質転換されたトランスジェニックタバコ細胞とトランスジェニックタバコ植物を提供するものである。

(2)

特開平5-84075

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 S-アデノシルメチオニンのメチル基を、ブトレッシンの8-アミノ基へ転移させる反応を触媒する性能を特徴とし、その外のタバコタンパク質を實質的に含有していないタバコタンパク質。

【請求項2】 さらに、(a) 分子量が50~85キログルトン、(b) 未変性等電点がpH5.0~6.0、(c) ブトレッシンについてのKmが300~500μM、および(d) S-アデノシルメチオニンについてのKmが100~150μMであることを特徴とする請求項1記載のタバコタンパク質。

【請求項3】 配列番号1、配列番号2、または配列番号3で定義されるアミノ酸配列を含有する請求項2記載のタバコタンパク質。

【請求項4】 (a) ブトレッシンN-メチルトランスフェラーゼがアニオン交換媒体に保持されるような、添加温度およびタバコ抽出液のpHと化学組成で、タバコ抽出液をアニオン交換媒体に加え、ならびに(b) ポリアミンを含有していなければ、ブトレッシンN-メチルトランスフェラーゼがアニオン交換媒体に保持されるような、溶離温度および溶離緩衝液のpHおよび化学組成で、有効量のポリアミンを含有する溶離緩衝液で、ブトレッシンN-メチルトランスフェラーゼをアニオン交換媒体から溶離する、ことを特徴とする、ブトレッシンN-メチルトランスフェラーゼをタバコ植物抽出液から精製する方法。

【請求項5】 ポリアミンが、ブトレッシン、N-メチルブトレッシン、スベルミン、スベルミジン、アグマチン、カダベリンまたはその混合物である請求項4記載の方法。

【請求項6】 アニオン交換媒体が、ジエチルアミノエチル、ポリエチレンジイミノ、第三級アミノ、第四級アミノ、p-アミノベンジルおよびジエチル(2-ヒドロキシプロピル)アミノエチルから選択される一つ以上の機能部分をもっている請求項4または5に記載の方法。

【請求項7】 機能部分がジエチルアミノエチルで、アニオン交換媒体が好ましくはジエチルアミノエチルアガロースである請求項6記載の方法。

【請求項8】 (a) 添加温度が2~10℃で好ましくは4~8℃であり、(b) 抽出液のpHが7.2~8.3で好ましくは約7.5であり、および(c) 抽出液が、(i) 有効量の緩衝剤、(ii) 有効量の還元剤、(iii) 有効量の水溶性変性剤および(iv) 有効量の重金属キレート剤を、含有している請求項4記載の方法。

【請求項9】 (a) 溶離温度が18~26℃、(b) 溶離緩衝液のpHが7.2~8.3で好ましくは約7.5であり、(c) さらに溶離緩衝液が、(i) 有効量の緩衝剤、(ii) 有効量の還元剤、(iii) 有効量の水溶性変性剤および(iv) 有効量の重金属キレート剤を、含有している請求項4記載の方法。

2

【請求項10】 (i) 約10mMのトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、(ii) 約2mMジチオトレイトール、(iii) 約20% (V/V) のグリセリンおよび(iv) 約1mMのエチレンジアミン四酢酸を、抽出液が含有する請求項8記載の方法、または上記4成分を溶離緩衝液が含有する請求項8記載の方法。

【請求項11】 ポリアミンがブトレッシンであり、溶離緩衝液中0.5~50mMの量で存在している請求項8または10に記載の方法。

【請求項12】 ブトレッシンが、溶離緩衝液中約5mMの量で存在している請求項11記載の方法。

【請求項13】 アニオン交換媒体溶離緩衝液の存在下でブトレッシンN-メチルトランスフェラーゼに対して親和性を有するクロマトグラフィ媒体に、抽出液を直接添加し、次いで結合した物質をクロマトグラフィ媒体から溶離することによってアニオン交換抽出液を濃縮する工程をさらに有する請求項4記載の方法。

【請求項14】 前記クロマトグラフィ媒体がω-アミノヘキシルアガロースである請求項13記載の方法。

【請求項15】 請求項1、2または3に記載のタバコタンパク質をコードする組換えDNA分子。

【請求項16】 さらに、作動可能に連結された調節配列を含有し、タバコタンパク質をコードする配列がセンス配向である請求項15記載の組換えDNA分子。

【請求項17】 請求項16の組換えDNA分子がコードするmRNAと雑種を形成するDNAをコードするアンチセンス組換えDNA分子。

【請求項18】 請求項16のセンス組換えDNA分子を含有するベクター。

【請求項19】 請求項17のアンチセンス組換えDNA分子を含有するベクター。

【請求項20】 請求項15、16または17の組換えDNA分子で安定に形質転換された培養トランスジェニックタバコ細胞。

【請求項21】 請求項18または19のベクターで安定に形質転換された培養トランスジェニックタバコ細胞。

【請求項22】 未形質転換の対照タバコ植物よりニコチン含量が高いことを特徴とする、請求項15もしくは16記載の組換えDNA分子または請求項18記載のベクターで安定に形質転換されたトランスジェニックタバコ植物。

【請求項23】 未形質転換の対照タバコ植物よりニコチン含量が低いことを特徴とする、請求項15もしくは17記載の組換えDNA分子または請求項19記載のベクターで安定に形質転換されたトランスジェニックタバコ植物。

【発明の詳細な説明】

【0001】 この発明は、高度に精製されたブトレッシンN-メチルトランスフェラーゼ、その新規の精製方

(3)

特開平5-84075

3

法、およびそのアンチセンス遺伝子およびセンス遺伝子に関する。特にこの発明は、ニコチンレベルを遺伝的に変化させたトランスジェニックタバコ植物を創製するためのセンスおよびアンチセンスのプトレッシンN-メチルトランスフェラーゼ遺伝子の使用に関する。このようなトランスジェニック植物は、タバコ産業に用いる乾燥タバコ葉を製造するのに有用である。

【0002】タバコからニコチンを除くために各種の方法が採用されている。しかしこれらの方法のほとんどが、ニコチンに対して充分に選択的でない。これらの方法はタバコから他の成分を除去するのでタバコの風味と香気に不利な影響を与える。その上に、このような方法は、一般に複雑で費用が高い。

【0003】ニコチンと生化学的に合成される化合物は、一般に一連の生化学反応によって形成され、各反応は異なる酵素によって触媒される。所定の化合物をもたず特定の反応系列が一つの経路として知られている。経路の作動とその最終生成物の産生を阻害する1方法は、その経路に必要な酵素量を減らすことである。経路の他の酵素に比べてその酵素の濃度が、通常、経路の作動においてその酵素を律動的にするよう充分に低い場合、酵素の濃度が減少すると、最終生成物の産生量が低くなる。酵素の相対的濃度が、通常、律動的でない場合は、細胞中のその濃度は、経路の産生量を減少させるためには、酵素を律動的にするように充分に低下させねばならない。同様に酵素の相対的な濃度が律動的である場合、その濃度の増大によってその経路の最終生成物の産生量が增大する。

【0004】ニコチンは最初にタバコ植物の根で形成され、次に葉に輸送され、葉の貯蔵される (Tso, *Physiology and Biochemistry of Tobacco Plants*, 233~234頁, Dowden Hutchinson & Ross, 米国, ペンシルヴェニア州, ストラウスバーグ, 1972年)。ニコチン分子は、二つの複素環、ピリジン部分およびピロリジン部分で構成され、その各々は別個の生化学経路から誘導される。ニコチンのピリジン部分はニコチン酸から誘導される。ニコチンのピロリジン部分は、プトレッシンからN-メチルプトレッシンに至り、次いでN-メチルピロリンに至る経路によって提供される。ニコチン合成時の必須の工程は、プトレッシンからN-メチルプトレッシンを生成する工程である (Goodwin & Mercer, *Introduction to Plant Biochemistry*, 488~491頁, Pergamon Press, 米国, ニューヨーク, 1983年)。

【0005】プトレッシンのN-メチルプトレッシンへの変換反応は、メチル基供与体として働くS-アデノシルメチンを用いて行われ、酵素であるプトレッシンN-メチルトランスフェラーゼ ("PMT") によって触媒される。PMTは、タバコ内でのニコチン合成用のN-メチルピロリンを供給する経路で律動酵素のようである

4

(Fetisov, "Regulation in Tobacco Callus of Enzyme Activities of the Nicotine Pathway", *Planta*, 188巻, 402~407頁, 1986年; Warner等, "The Regulation of Enzyme Activities of the Nicotine Pathway in Tobacco", *Physiol. Plant*, 68巻, 667~672頁, 1986年)。

【0006】比較的に粗製のPMT製剤(30倍の精製度)について限定的な特性決定がなされている (Nizuka等, "Phytochemical Studies on Tobacco Alkaloids XIV. The Occurrence and Properties of Putrescine N-Methyltransferase in Tobacco Plants", *Plant Cell Physiol.*, 12巻, 633~640頁, 1971年)。その製剤に至る精製工程は、最初の抽出液からの硫酸アンモニウム沈澱法とグルコースクロマトグラフィーに限定した。

【0007】植物によって通常得られるよりも有意に低いレベルの酵素(またはその他のタンパク質)を特徴とする植物を、アンチセンスRNA法によって作ることができる。通常、標的酵素をコードする遺伝子の転写すると一本鎖mRNAが生成し、そのRNAは次にリボソームによって翻訳されて標的酵素が得られる。アンチセンスRNA分子は、そのヌクレオチド配列が標的mRNA分子のある部分に対して相補的なRNA分子である。したがってアンチセンスRNA分子は、標的mRNA分子と相補的塩基対合を行い(雑種形成)、その標的mRNA分子を翻訳に利用できないようにして一層分解し易くし、または両方を行う。したがって、標的mRNAがコードする特異的酵素を産生する細胞の機能が阻害される。

【0008】アンチセンス法は、いくつかの研究で採用され、特異的な酵素が通常の量より低いことを特徴とするトランスジェニック植物が創製されている。例えば、低レベルのカルコンシンターゼ(花の色素の生合成経路の酵素)を含有する植物が、カルコンシンターゼのアンチセンス遺伝子をタバコとベチュニアのゲノムに挿入することによって生産されている。これらのトランスジェニックタバコ植物とトランスジェニックベチュニア植物は、通常の着色よりうすい色の花を産生する (Van der Krol等, "An Anti-Sense Chalcone Synthase Gene in Transgenic Plants Inhibits Flower Pigmentation", *Nature*, 333巻, 866~868頁, 1988年)。またアンチセンスRNA法は、トマト類に、ポリガラクトナーゼ酵素が産生するのを阻害するために採用されて成功しており (Smith等, "Antisense RNA Inhibition of Polygalacturonase Gene Expression in Transgenic Tomatoes", *Nature*, 334巻, 724~726頁, 1988年; Sheehy等, "Reduction of Polygalacturonase Activity in Tomato Fruit by Antisense RNA", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85巻, 8805~8809頁, 1988年)、およびタバコに、リブロ

(4)

特開平5-84075

5

ースピリン酸カルボキシラーゼ酵素の小さなサブユニットを産生するのを阻害するのに成功している (Roderick等, "Nuclear-organelle Interactions: Nuclear Antisense Gene Inhibits Ribulose Biphosphate Carboxylase Enzyme Levels in Transformed Tobacco Plants", Cell, 55巻, 673~681頁, 1988年)。

あるいは、所定の酵素の通常量より多いことを特徴とするトランスジェニック植物を、センス (すなわち通常の) 配向のその酵素の遺伝子で植物を形質転換することによって創製することができる。

【0009】PMTのレベルを変化させることによって、タバコ植物のニコチンレベルを上下させるタバコ植物の遺伝子工学はまだ可能になっていない。その理由は、PMT酵素を予め精製することなしにPMT遺伝子をクローン化する方法が知られておらず、またPMT酵素の精製法はこの発明以前に知られていなかったからである。

【0010】この発明は、第1に、高度に精製されたブトレンシンN-メチルトランスフェラーゼ ("PMT") と、この酵素の新規な精製法を提供するものである。

【0011】この発明の精製法は、タバコ植物抽出液をアニオン交換媒体に添加する工程を有し、添加温度および抽出液のpHと組成は、PMTがアニオン交換媒体によって保持されるような条件である。次にPMTを、有効量のポリアミンを含有する溶離緩衝液で、アニオン交換媒体から溶離する。また溶離温度および溶離緩衝液のpHと化学組成は、ポリアミンがなければ、PMTがアニオン交換媒体によって保持されるような条件である。

【0012】好ましい態様において、アニオン交換媒体の抽出液を、アニオン交換媒体の溶離緩衝液の存在下、PMTに対して親和性を有するクロマトグラフィ媒体に直接添加し、次に、結合された物質を溶離する。最も好ましくは、アニオン交換カラムからの出口がω-アミノヘキシルアガロースカラムの入口に接続され、後者のカラムにアニオン交換カラムからの希薄PMTが集められ、次いでより濃縮された形態でPMTが溶出される。

【0013】この発明のPMTは、分子量が約55~65キロダルトン、未変性の等電点が約5.0~6.0のpH、ブトレンシンについてのKm値が約300μM~500μM、およびS-アデノシルメチオニンについてのKm値が約100μM~150μMである。好ましい態様では、PMTは、配列表に配列番号1、配列番号2および配列番号3として規定されているアミノ酸配列から選択される17のアミノ酸の配列をもっている。

【0014】またこの発明は、ブトレンシンN-メチルトランスフェラーゼをコードするセンス組換えDNA分子とアンチセンス組換えDNA分子、これらの組換えDNA分子を含有するベクター、およびこれらのDNA分子またはベクターで形質転換されたトランスジェニック

6

タバコ細胞とトランスジェニックタバコ植物を提供するものである。この発明のトランスジェニックタバコ細胞とトランスジェニックタバコ植物は、未形質転換の対照のタバコ細胞とタバコ植物よりニコチン含量が低いまたは高いことを特徴としている。

【0015】PMTの精製

PMT精製に用いる出発物質はタバコの根で構成されている。その根は水耕栽培されたタバコ植物から収穫することが好ましい。水耕栽培法は、高度に制御された再現性のある条件下で植物を成長させることが容易であり、洗浄で無傷の状態で、広がった糸状根系を効率よく収穫することができる。

【0016】タバコの種子は、温湿した植物鉢植え混合物の表面もしくはその近傍で発芽させることができる。最も好ましい条件は約80°Fの温度と80%の相対湿度である。種子が発芽してから約2週間後、実生苗を間引きし (除去し)、残留実生苗が高さが約6インチで約6枚の葉が生成する時期まで、妨害されずに成長するのに十分な余白を残す。実生苗が、約6インチの高さに到達したとき、一般に、根系と鉢植え物質のペレットはそのまま、適切な養分溶液が入れられ、この養分溶液の通気 (酸化) 手段を備えた水耕装置に移植される。またこの水耕栽培装置は、溶離された養分を補充するように設置されていなければならず、かつ充分に成長したタバコ植物を収容するのに充分な大きさでなければならない。

【0017】頭状花の除去 (摘花) は商業的タバコ栽培における標準の慣行であるが、根の成長を増大して葉のニコチン含量を増大することは、当該技術分野では公知である。それ故に、PMTの精製用の出発物質として使用される植物は、通常、成長の適当な段階で摘花される。植付けと摘花の適切な間隔は、とりわけ、植物の品種、光の強度、日長、土壌と空気の温度、土壌水分および栄養素を含むいくつもの因子によって定まる。しかし、一般に根は摘花してから3~7日後に収穫される。所定の組合せの生育条件下で栽培される所定のタバコ品種の摘花の最適時期は、当該技術分野の熟練者ならば容易に決定することができる。

【0018】収穫された根は冷水で洗浄することが好ましく、次に残留水をブフナー漏斗で吸引して除去する。次に洗浄した根は、収穫して直ちに、使用されるかまたは-80°Cに凍結される。凍結された根は、使用するまで約-80°Cで貯蔵される。

【0019】一般的なPMT精製法では、抽出緩衝液1 l当たり約400~600gの凍結根組織を高速混合器でホモジナイズする。抽出緩衝液は、一般に、一つ以上の緩衝剤、一つ以上の還元剤、一つ以上の重金屬キレート剤、一つ以上の水溶性変性剤、および一つ以上のプロテアーゼ阻害剤それぞれの有効量を含有している。また抽出緩衝液は、一つ以上のフェノール系化合物吸着剤の

(5)

特開平5-84075

7

有効量を含む方が好ましい。これらの薬剤の有効量は、使用される特定の薬剤によって決まる。しかし使用量は、一般に、植物タンパク質の精製中に使用される一般的な量から選択される。したがって、薬剤とその有効量の選択は、通常の研究者の技能の範囲内にある。

【0020】抽出緩衝液のpHは、約7.2~8.3の範囲になければならないが、好ましくは約7.5である。所望のpHで有効なpH緩衝能を与える解離定数(pKa)を有する水溶性化合物が使用される。また好ましい緩衝剤は紫外線を事実上透過する。適切な緩衝剤には、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン("Tris"), イミダゾール、リン酸塩、N-モルホリノプロパンスルホン酸("MOPS"), N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸("TES"), トリエタノールアミン、およびN-トリス(ヒドロキシメチル)-メチルグリシン("Tricine")が含まれる。トリス緩衝剤が好ましい。

【0021】タンパク質のスルフィド基の起りうる酸化反応と、植物のフェノール化合物の起りうる酸化反応とを阻害して反応性遊離ラジカルの生成を阻害するために、還元剤を抽出緩衝液に添加する。これら両方の反応はPMTを不活性化することがある。適切な還元剤には、ジチオトレイトール("DTT"), ジチオエリトリートール、2-メルカプトエタノール、チオグリコール酸塩、グルタチオン、システイン、およびアスコルビン酸塩が含まれる。DTTとアスコルビン酸塩が好ましい。

【0022】重金属キレート化剤は、プロテアーゼ類の活性化、および重金属との直接相互作用によるまたはフェノール化合物を酸化してPMTを不活性化する種にする反応の重金属による促進によって起りうるPMTの不活性化を防止するために、抽出緩衝液に添加される。好ましい重金属キレート化剤としては、エチレンジアミン四酢酸("EDTA")があるが、他の通常のキレート化剤例えばエチレンジアミン四酢酸(β-アミノエチルエーテル)N,N,N',N'四酢酸("EGTA")およびクエン酸塩も使うことができる。

【0023】水活性変性剤は、PMTを不活性化させる、起りうる変性とその他の一層微少な配座の変化に対してPMTを安定化するために、抽出緩衝液に添加される。このような水活性変性剤は、非イオン性の親水性化合物であり、これらが添加される水溶液の水活性を低下させる。グリセリン、エチレンジアミン四酢酸および低分子量のポリエチレングリコール(例えば"PEG400")が好ましいが、グルコース、スクロース、フルクトースおよびソルビトールが、水活性変性剤として有用な他の化合物の例である。

【0024】プロテアーゼ阻害剤は、組織を均質化中に放出されるタンパク質分解酵素によるタンパク質切断によるPMTの起りうる不活性化を防止するために、一般

8

に抽出緩衝液に添加される。有用なプロテアーゼ阻害剤には、フェニルメチルスルホニルフルオリド("PMSF"), ロイペプチン、アプロチニン、キモスタチンおよびベプスタチンが含まれている。PMSFとロイペプチンが好ましい。

【0025】フェノール系化合物の吸着剤は、存在していると、植物細胞が破壊されると酸化されて、PMTを不活性化もしくは沈澱させるフェノール系植物化合物を除くために、抽出緩衝液に添加することが好ましい。一般に、フェノール系化合物を吸着するために、不溶性のポリビニルピロリドン("PVPP")とアンバーライトXAD-4を抽出緩衝液中に懸濁させる。PMT酵素の活性に対して有害な害を与えることなしに、フェノール系化合物を除去するかまたは不活性化する他の物質には、PVPPもしくはアンバーライトXAD-4とこれらのものの代わりに使えるものが含まれる。

【0026】根組織を添加する前に、抽出緩衝液は約-15°C~-20°Cに冷却され、凍結スラリーを生成させる。均一化の工程中、ホモジネートの温度は約3~5°C以上に上昇させてはならない。

【0027】当該技術分野の通常の熟練者には分かっているように、上記の方法に用いられる根組織の量は変えることができるが、使用される組織のおおよその重量は測定しなければならず、それに応じて、使用される他の成分の量が調節される。

【0028】均一化処理の後、不溶性物質(吸着されたフェノール化合物を含むPVPPを含む)は、ホモジネートから除去するのが好ましい。この除去は、好ましくは、約10000~20000×gに設定された冷凍遠心機で、約4°Cで約30~90分間沈降させることによって行われる。不溶性物質を沈降させた後、可溶性抽出液(すなわち上澄み液)をデカントする。可溶性抽出液の最終のタンパク質濃度は一般に約2.5~3.5mg/mlである。

【0029】可溶性抽出液を硫酸アンモニウムで分離、濃縮の方法(Scoopes, Protein Purification Principles and Practice, 48~52頁, Springer-Verlag, 米国, ニューヨーク, 1982年)にしたがって、40%~85%硫酸アンモニウムの固分(沈澱)を、可溶性抽出液から集める。次にその固分を、根の重量1g当り約0.1~0.4mlの溶解緩衝液に溶解する。

【0030】40%~85%硫酸アンモニウムの固分を溶解するのに好ましい緩衝液は、有効量の、緩衝剤、重金属キレート化剤、還元剤、水活性変性剤およびプロテアーゼ阻害剤を含む。最も好ましい溶解緩衝剤は、トリス緩衝液(pHが約7.5)(約10~20mM)、EDTA(約1~10mM)、グリセリン(約10~30%)、DTT(約1~10mM)、PMSF(約0.2~10.0mg/l)、およびロイペプチン(約0.2~10.0mg/l)を含む。これ

9

らの緩衝成分は、抽出緩衝液中の類似の成分に対する上記の目的のために含有させてある。当該技術分野の熟練者は、これらの成分は類似の機能を有する他のもので取換えることができることを知っているであろう。

【0031】前記の硫酸アンモニウム画分を、次いで標準の方法、例えば透析もしくはふるいクロマトグラフィーで脱塩し、次いで脱塩された画分を、下記のようにしてアニオン交換クロマトグラフィーに直接かける。しかし好ましい態様では、硫酸アンモニウム画分は最初に、疎水性相互作用クロマトグラフィーにかけられる。

【0032】溶解された硫酸アンモニウム画分を疎水性相互作用クロマトグラフィーにかける前に、塩を添加して、PMTが疎水性相互作用媒体と結合するのを保証するのに充分高い塩濃度を与える。添加する塩の好ましい濃度は1、5Nである。添加される好ましい塩はNaClである。他の有用な塩は硫酸アンモニウムである。

【0033】好ましい疎水性相互作用媒体は、大きさがクロマトグラフィーに適し、共有結合したフェニル基を有する、ほぼ球形粒子の架橋アガロースゲルで構成されている。このようなフェニルアガロースは、“フェニルセファロースCL-4B”として市販されている(Pharmacia-LKB, Inc., 米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ、カタログ番号: 17-0810-01)。

【0034】水和フェニルアガロースを、標準的方法を用いて適切なクロマトグラフィーのカラムに充填し、pHが約7、2~8、3好ましくは約7、5の高塩平衡化緩衝液で、約4~8℃にて平衡化する。好ましい高塩平衡化緩衝液は、有効量の、緩衝剤、重金属キレート化剤、水溶性変性剤および還元剤、ならびに約1、5~2、0Mの濃度の塩を含有している。最も好ましい高塩平衡化緩衝液は、約10mMのトリス(pHは約7、5)、約1、5MのNaCl、約1mMのEDTA、約2mMのDTTおよび約20%(V/V)のグリセリンを含有している。

【0035】塩で調節された可溶性抽出液の試料(フェニルアガロースの充填カラム容積1ml当たり約0、5~2、0mlの抽出液)を、平衡化されたフェニルアガロースカラムに注入し、抽出液にタンパク質性物質が特に含有されなくなるまで、カラムを平衡化緩衝液で洗浄する。緩衝剤が紫外光を透過するならば、上記の状態は約280nmの波長の紫外光の吸光度を測定することによって決定される。一般に、フェニルアガロースカラムを、約5~7倍カラム容積の平衡化緩衝液で洗浄する。PMTは、疎水性相互作用媒体に結合して残留する。

【0036】フェニルアガロースマトリックスに依然として吸着されているタンパク質(PMTを含む)は、次に4~8℃にて、負荷塩濃度が(好ましくは約1、5M)から約0、0Mまで減少する線状塩勾配液を含有する、カラムの約4~6倍容積の溶解緩衝液を用いて溶離し、次にカラムの2~3倍容積の追加の塩なし溶離緩衝

(6)

特開平5-84075

10

液で溶離する。好ましくは、溶離緩衝液は、トリス(約10mM)(pHは約7、5)、DTT(約2mM)およびEDTA(約1mM)とグリセリン(約20%V/V)を含有している。

【0037】約0、01~0、03倍カラム容積の画分を集め、以下のようにしてPMT活性を、280nmの波長の吸光度について検定した。一般に集めた抽出液画分は、約1~2倍のカラム容積と、約0、4~2、5mg/mlのタンパク質濃度をもっている。

【0038】好ましいNaCl以外の塩も、前記の緩衝液に用いることができることは理解されるであろう。かような塩には、塩化カリウムおよび硫酸アンモニウムが含まれる。

【0039】この発明の精製方法の重要な工程は、下記のようにして実施される新規なアニオン交換クロマトグラフィーの工程である。この工程を実施するには、カラムに添加されるタバコ植物抽出液(例えば、好ましくはフェニルアガロース抽出液)は、抽出液中のPMTがアニオン交換媒体に結合するようなpHと化学組成でなければならない。すなわち、抽出液は、pHが約7、2~8、3で、約0、0~10mM塩を含有していなければならない。好ましくはさらに以下のものすなわち、約5~10mMの緩衝剤、約1~10mMの還元剤、約10~30%(V/V)の水溶性変性剤、および約1~5mMの重金属キレート化剤を含有すべきである。最も好ましくは、タバコ植物抽出液は、10mMのトリス/HCl(pH7、5)、2mMのDTT、1mMのEDTAおよび20%(V/V)のグリセリンを含有している。

【0040】当該技術分野の熟練者には、勿論、タバコ植物抽出液のpHと塩濃度を、上記の数値から一斉に変化させて、PMTが依然としてアニオン交換媒体と結合する負荷状態にすることができることは明らかであろう。特に、塩濃度を増加すると一般に、タンパク質のアニオン交換媒体に対する結合性が減少し、またpHを上昇させると、一般にタンパク質のアニオン交換媒体に対する結合性が増大する。それ故に当該技術分野の熟練者は、PMTがアニオン交換媒体と結合する、上記以外の塩濃度とpHの各種の組合せを容易に決定することができるであろう。可能なpH/塩濃度の組合せの唯一の制約は、pHが、PMTを活性し不活性化するほどに高くないということである。一般に、PMTは、約9以上のpHに有意な時間暴露すべきではない。

【0041】上記のことから、アニオン交換媒体に添加されるタバコの根の抽出液が硫酸アンモニウムによる画分か、または上記の疎水性相互作用クロマトグラフィーの工程からの抽出液の場合、その抽出液は、適当な緩衝液に脱塩しなければならないことは明らかである。この脱塩は標準の方法で達成される。例えば、ゲル濾過クロマトグラフィー(例えばセファデックスG-25を用いる)または透析が、公知の方法を用いて利用できる。このよ

11

うな脱塩は透析で行うのが好ましい。

【0042】好ましい方法では、前記の疎水性相互作用クロマトグラフィ工程から集めた溶出液（または他の高温タバコ植物抽出液）は、集めた溶出液もしくは抽出液1ml当り約15～25mlの透析緩衝液に対して、約4～8℃にて約8～20時間、透析される。透析緩衝液は攪拌する方が好ましい。10000KDカットオフの透析膜が好ましい。透析緩衝液の化学組成とpHは、透析画分中のPMTが、前記のようにアニオン交換媒体で保持されるように選択される。

【0043】アニオン交換媒体は、一つ以上の機能性のアニオン交換部分を有し、クロマトグラフィに適した大きさの比較的硬質の粒子（例えば架橋されたアガロース）で構成されていなければならない。かようなアニオン交換媒体は、ジエチルアミノエチル、ポリエチレンジアミン、第三級アミノ、第四級アミノ、p-アミノベンジルおよびジエチル（2-ヒドロキシプロピル）アミノエチルからなる群から選択される。このような媒体は市販されている。ジエチルアミノエチル（“DEAE”）部分を持っているアニオン交換媒体が好ましい。DEAE-アガロース（“DEAE-Sepharose, Fast Flow”, Pharmacia-LKB, Inc., 米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ、カタログ番号: 17-0709-01）が最も好ましい。

【0044】アニオン交換媒体は、標準方法によって、平衡化緩衝液のpHと塩の状態で平衡化される。

【0045】平衡化されたアニオン交換媒体は、次いで、底部に、媒体を保持する手段（例えば半密封ガラスディスク）と出口管とを有するカラム（すなわち中空管）に標準の方法で充填する。次にカラムの頂部にふたをし、入口管に接続する。次いで、好ましくは平衡化緩衝液をカラムに通過させ、通過液のpHと伝導率を監視して、媒体が適正に平衡化されていることを保証しなければならない。

【0046】カラムは、添加されるタバコ植物抽出液中のタンパク質が、すべて結合した場合、媒体の容量のわずかに約50%を占めるのに充分なアニオン交換媒体を含有していなければならない。例えば添加されるタバコ植物抽出液が上記の透析されたフェニルアガロース抽出液の場合、カラムには、透析されたフェニルアガロース抽出液1ml当り約0.04～0.10ml（充填カラム容積）のDEAE-アガロースが入っていなければならない。

【0047】好ましくは、カラムに媒体を充填し、タバコ植物抽出液を添加するときと同じ温度で媒体を平衡化する。カラムが、タバコ植物抽出液を添加するときの温度より暖かい温度で洗浄もしくは溶離する場合、アニオン交換マトリックスを含有するスラリーは、カラムに充填する前に脱ガスを行う。

【0048】アニオン交換媒体に添加されるタバコ植物

(7)

特開平5-84075

12

抽出液について先に述べたように、アニオン交換媒体の平衡化緩衝液は、PMTが媒体によって保持されるようなpHと化学組成をもっていなければならない。同様に、当該技術分野の熟練者は適切なpH/化学組成の組合せを容易に決定することができる。好ましい平衡化緩衝液には、特に塩は全く添加されておらずpHは約7.2～8.3であり最も好ましいのは7.5である。より好ましい平衡化緩衝液は、有効量の、緩衝剤、重金属キレート化剤、還元剤および水溶性変性剤を含有している。最も好ましい平衡化緩衝液は、10mMのトリス/HCl (pH7.5)、1mMのEDTA、2mMのDTTおよび20% (V/V) のグリセリンを含有している。

【0049】タバコ植物抽出液、平衡化緩衝液およびアニオン交換媒体はすべて、平衡化、負荷およびカラムの洗浄の前および実施中、温度が好ましくは約2～10℃であり、最も好ましくは約4～8℃である。

【0050】タバコ植物抽出液は、約0.1～0.3倍容積/分の流量で添加される。タバコ植物抽出液を添加して通過した流体は、事実上PMTを含有していないので廃棄される。次にカラムは、タンパク質性物質の溶出が低レベルで安定化するまで平衡化緩衝液で洗浄する。その平衡化緩衝液が280nmで吸光する緩衝剤を含有していない場合は、カラムを、280nm波長の紫外光の吸光度が低レベルで安定化するまで溶離緩衝液で洗浄する。一般に、アニオン交換媒体は、5～10倍容積の、10mM NaCl 含有平衡化緩衝液で洗浄し、次いで別の3～10倍容積の、NaClなしの平衡化緩衝液で洗浄する。PMTは上記洗浄工程中アニオン交換媒体に保持されている。

【0051】洗浄後、PMTは、有効量のポリアミンを含有する溶離緩衝液で、アニオン交換媒体から溶離されるが、溶離温度、および溶離緩衝液のpHと化学組成は、ポリアミンがなければPMTがアニオン交換媒体に保持される条件である。

【0052】溶離緩衝液中のポリアミンは、ブトレッシン、N-メチルブトレッシン、スベルミン、スベルミジン、アグマチン、カダベリンおよびその混合物からなる群から選択される。ブトレッシンが好ましいポリアミンである。ポリアミンは、溶離緩衝液中、約0.5～50mM、好ましくは1～10mM、最も好ましくは約5mMの濃度で存在していなければならない。

【0053】溶離緩衝液はさらに、有効量の、緩衝剤、重金属キレート化剤、還元剤および水溶性変性剤を含有していることが好ましい。これらの成分は、抽出緩衝液について先に述べたものと同じである。有効量のこれらの成分は、当該技術分野の熟練者によって、余分の試験をせずに測定することができる。溶離緩衝液のpHは、約7.2～8.3、好ましくは約7.5でなければならない。アニオン交換媒体の平衡化緩衝液にポリアミンを補

50

(8)

特開平5-84075

13

充すると、適切な溶離緩衝液になる。適切な溶離緩衝液は、10 mMのトリス/HCl (pH 7.5)、1 mMのEDTA、20% (V/V) のグリセリン、2 mMのDTT、および5 mMのブトレッシン (1, 4-ジアミノブタン) (Sigma Chemical Co., 米国、ミズリー州、セントルイス、カタログ番号: P7505) を含有している。

【0054】アニオン交換カラムからのPMTの溶離は、約18~28℃ (すなわち室温) で行うのが好ましい。溶離緩衝液とアニオン交換カラムは、溶離が開始される前に、選択された溶離温度でなければならぬ。

【0055】PMTをカラムから溶離するには、溶離緩衝液を、約0.02~0.10倍のカラム容積/分の流量で添加し、画分はカラムの底部から集める。また溶出液は単一の溶出液プールに集められる。最も好ましい溶離方法では、約1倍容積の溶離緩衝液がカラムに添加され、次に流動を停止させる。アニオン交換媒体は、溶離緩衝液の1部と約1~8時間、好ましくは約1時間接触したままにしておく。次いで溶離緩衝液の添加を再開する。

【0056】PMTはアニオン交換媒体から極めてゆっくりと溶出させる。一般に、アニオン交換媒体は、約40~70倍容積の溶離緩衝液で溶離され、最も好ましくは、少なくとも50倍容積の溶離緩衝液で溶離される。PMTの溶離状態を監視するために、溶離された画分のPMT活性が下記のようにして検定される。

【0057】PMTは比較的希薄な状態で比較的大容積で回収されるので、アニオン交換溶出液を濃縮することが望ましい。その溶出液は、例えばアニオン交換媒体の溶離緩衝液の存在下、PMTに対して親和性を有するクロマトグラフィ媒体に添加され、そのクロマトグラフィ媒体から、結合物質を、良好な収率で比較的速縮した形態で溶出することができる。あるいは、PMTは沈殿させてもよい。この発明の好ましい方法では、溶離中、アニオン交換カラムの出口は濃縮カラムの入口に接続されている。このようにして、溶離されたPMTはアニオン交換カラムから流出して直接に濃縮カラムに入り、そこで吸着される。PMTのアニオン交換カラムからの溶離が完了した後、そのカラムの出口を濃縮カラムからはずし、PMTを濃縮カラムから溶離する。

【0058】好ましい濃縮カラムは、 ω -アミノヘキシルアガロース (" ω -アミノヘキシル-セファロース4B", Sigma Chemical Co., 米国、ミズリー州、セントルイス、カタログ番号: A8894) ("AHS") を、アニオン交換カラムの10~30%のカラム容積で利用する。PMTは、比較的高い濃度の塩、好ましくは1.5 M NaCl を含有する溶離緩衝液で、このカラムから溶離される。溶離緩衝液は、好ましくは、さらに、有効量の、緩衝剤、重金属キレート剤、還元剤、および水活性変性剤を含有している。最も好ましい溶離緩衝液

14

は、1.5 MのNaCl、10 mMのトリス/HCl (pH 7.5)、1 mMのEDTA、20% (V/V) のグリセリンおよび2 mMのDTTを含有している。濃縮カラムは、4~8℃で負荷され溶離されるのが好ましい。

【0059】濃縮カラムからの最初の4~8倍容積の溶出液が、PMTの活性の大部分を含有している。その画分は、好ましくは限外濾過装置 (Amicon Corp. 米国、マサチューセッツ州、ダンバースが市販している "セントリコン30" など) でさらに濃縮される。限外濾過を行った後、試料は一般に約0.04~0.70 mg/mlのタンパク質濃度をもっている。いくつものかような濃度カラムからの一般にPMTを含有している画分を集めてさらに濃縮する。

【0060】アニオン交換と試料濃縮の工程の後には得られたPMTはさらに分取規模の等電点焦点化電気泳動法で精製される。等電点焦点化電気泳動法では、試料の混合物を、安定化したpH勾配液中に置き、次いでこの勾配液に電圧を印加する。各タンパク質種は、そのたんばく種の正味の電荷が零のpH勾配液の点にむかって電気泳動的に移動する。タンパク質の正味の電荷が零の場合のpHは、そのタンパク質の等電点と呼ばれる。

【0061】スクロース溶液類とポリアクリルアミドゲル類を含む各種のpH勾配液安定化媒体を使用することができる。同様に、pH勾配液を分離して、等電点焦点化電気泳動法の後タンパク質を回収する各種の方法を採用することができる。pH勾配液分離法は、勾配液安定化媒体と適合性であるように選択しなければならない。

【0062】好ましいpH勾配液安定化媒体は、ガラス管に入れたスクロース溶液 (密度勾配液) である。最も好ましくは、スクロース密度勾配液は、pHが約5~約8の範囲にあるpH勾配液を含有している。好ましい勾配液分離法では、活栓を通じて液体の流量が正確に制御される。集められた画分は、pHとPMT活性について試験される。等電点焦点化電気泳動法の装置、化学薬品およびプロトコールはいくつもの商業的企業から入手できる。

【0063】この発明の方法で単離されたPMTは他のタバコタンパク質を實質的に含有せず、PMTは製剤中の支配的なタンパク質である。製剤中の少数の汚染タバコタンパク質は、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法 ("SDS-PAGE") によって、標準の方法にしたがって分離される。このようにして、アミノ酸配列分析用に充分純粋なPMTが得られる。

【0064】PMTの特性決定

タバコPMTは、SDS-PAGEで測定した場合、約55~65キロダルトンの分子量を有し、等電点焦点化電気泳動法で測定した場合、pHが約5.0~6.0の未変性の等電点を有することが特徴である。

【0065】さらに、タバコPMTは、S-アデノシル

50

(9)

特開平5-84075

15

メチオニンのメチル基をブトレッシンの8-アミノ基へ転移させる反応を触媒する性能、およびブトレッシンに対する高い基質特異性を特徴としている。

【0066】ミカエリス-メンテン定数(K_m)は、初期の反応速度が、最大反応速度の1/2に等しくなるときの基質濃度として定義される。 K_m 値は、同じ反応を触媒する別個の酵素種については広く変化する。したがって K_m の測定値は酵素に対して有用な“同定マーカー”である。軽度精製されたタバコPMTは、ブトレッシンについての K_m 値が約300~500 μ Mであることを特徴としている。この発明の高度に精製されたタバコPMTは、S-アデノシルメチオニンについての K_m 値が約100~150 μ Mであることを特徴としている。

【0067】PMTの部分アミノ酸配列の決定

アミノ酸配列の分析の準備として、標準のSDS-PAGE法を用いて、アニオン交換、試料の濃縮および等電点焦点化電気泳動法の工程の後に残留している少数の汚染タンパク質類からPMTを分離する。SDS-PAGE法についての詳細なプロトコールは、Laemmli, "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", Nature, 227巻, 680~685頁, 1970年, および電気泳動法装置のメーカーから提供されるマニュアルに見られる。公知の方法によって、個々のタンパク質を含有するバンドを、薄いシートもしくは膜に電気泳動的に転移させ(電気ブロットさせ)、それに保持させ視覚化する。公知の一つの方法では、タンパク質のバンドを、ポリヨウ化(4-ヒニル-N-メチルピリジニウム)のような疎水性ポリカチオンでコートされたガラス微小繊維のシートに電気ブロットさせ、次にフルオレサミンのような非アニオン性染料によって視覚化する。他の方法は、タンパク質を、ポリニフ化ビニリデンの膜の上に("Immobilon-P", Millipore, 米国, マサチューセッツ州, ベッドフォード), 電気ブロットさせ、アミドブラックのようなアニオン染料で、バンドを視覚化する方法である(Bow等, "Alterations in the Phenotype of Plant Cells Studied by NH₂-Terminal Amino Acid Sequence Analysis of Proteins Electrophoretically Blotted from Two-Dimensional Gel-Separated Total Extracts", Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 84巻, 4808~4810頁, 1987年; A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing, Paul T. Matsudaira編著, Academic Press, 米国, ニューヨーク, 1989年)。

【0068】単離されたタンパク質を、電気泳動ゲルから転移させ、転移させたタンパク質を視覚化する上記方法が好ましい。しかし、電気泳動法で単離されたタンパク質を配列分析用に準備するのに用いられる材料と方法の変化は、この発明から除外されないということは、当

16

該技術分野の熟練者にとって明らかなことであろう。

【0069】バンドを構成する精製PMTは、見掛けの分子量(すなわち約80KD)で同定される。タンパク質のバンドを電気泳動ゲルから膜に転移させ、転移させたバンドを視覚化した後、精製PMTの個々のバンドを有する膜片を、隣接するタンパク質のバンドによる汚染を避けて正確に切取る。

【0070】タンパク質バンド(上記のようにして単離された)を構成する精製タバコPMTについて、標準の自動測定法によってアミノ末端配列を分析する。タバコPMTタンパク質は、配列番号1、配列番号2および配列番号3から選択されるアミノ酸配列を含有している。

【0071】配列番号1は、“a1”バンド(図5)からの配列であり配列番号2は“a2”バンド(図5)からの配列である。配列番号3は、配列番号1と配列番号2の共通配列である。

【0072】密接している精製タンパク質のバンドからの配列が高度に相同性なことは、複合形のタバコPMTタンパク質が存在していることを示唆している。このような複合形のタバコPMTタンパク質は、単一の遺伝子産物の翻訳後の修飾から、または複合形PMTの遺伝子から生成する。

【0073】PMT DNA配列のクローニング

この発明のPMTタンパク質の部分アミノ酸配列(配列番号1、配列番号2、配列番号3)は、次のようなオリゴヌクレオチドのセットを設計するのに用いられる。すなわちそのオリゴヌクレオチドの一つ以上が、タバコ根cDNAライブラリー中のPMT配列と選択的に雑種を形成する。この選択的な雑種形成は、PMTタンパク質の一部もしくは全体をコードする配列を含有するcDNAクローンを同定するのに用いられる。アミノ酸配列からのオリゴヌクレオチドプローブの設計についての説明は、Sambrook等, Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, 1989年の11章に記載されている。

【0074】かようなオリゴヌクレオチドプローブの合成は、市販の自動装置で日常実施されている。

【0075】cDNAライブラリーの構築は、現在、分子生物学の研究所では日常の作業である(Sambrook等の前記文献の8章参照)。同様に、対象の配列を含有するクローンを同定するために、オリゴヌクレオチドプローブによってcDNAライブラリーをスクリーニングすることは現在周知のことであり、当該技術分野の熟練者の能力内に充分含まれている。cDNAライブラリーをスクリーニングするのにオリゴヌクレオチドを使用することについての説明は、Sambrook等の前記文献の実験室マニュアルの11章に記載されている。オリゴヌクレオチドプローブとの雑種形成反応に基づいて選択されたcDNAクローンは、大きさ、制限部位の存在およびヌクレオチド配列に特徴がある。このようなDNA分析法

(10)

特開平5-64075

17

は、Sambrook等の前記文献、およびAusubel等、Short Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, 米国、ニューヨーク、1989年に充分に記載されている。このようにして得られたいずれのPMT cDNAクローンも、それ自体、ほかのPMT cDNAクローンの同定に用いるプローブとして使用できる。

【0078】タバコ【ニコチアナ・タバクム L. var. (Nicotiana tabacum L. var.) NK328】のゲノムライブラリーは市販されている (Clontech Laboratories, Inc., 米国、カリフォルニア州パロ・アルト)。前記のゲノムライブラリーは、販売者が提供するプロトコールにしたがってスクリーニングされ、タバコPMTをコードする染色体遺伝子が得られる。

【0077】したがって、この発明はタバコPMTタンパク質をコードする組換えDNA分子を提供するものである。

【0078】PMT DNA配列で、センス配向もしくはアンチセンス配向に安定に形質転換されたトランスジェニックタバコ細胞とタバコ植物の製造

【0078】またこの発明は、タバコPMTタンパク質をコードしかつPMTアンチセンスRNA分子をコードし、作動可能に調節配列に連結された組換えDNA分子で安定に形質転換されたトランスジェニックタバコ細胞とタバコ植物を提供するものである。

【0080】未形質転換の対照のタバコ植物よりもニコチン含量が低いタバコ植物を製造するために、タバコ細胞を、部分PMT cDNA配列、全長PMT cDNA配列、部分PMT染色体配列、または全長PMT染色体配列を含有し、作動可能に連結された適切な調節配列でアンチセンス配向にクローン化された人工のPMTアンチセンス転写ユニットで形質転換される。適切な調節配列には、転写開始配列(“プロモーター”)およびポリアダニル化/転写終結配列が含まれる。

【0081】トランスジェニックタバコ植物中のアンチセンス配列の発現には、一般にハナヤサイ・モザイクウイルス (CaMV) 35Sプロモーターを使用する (例えば、Cornelissen等, “Both RNA Level and Translation Efficiency are Reduced by Anti-Sense RNA in Transgenic Tobacco”, Nucleic Acids Res., 17巻, 833~843頁, 1989年; Rezaian等, “Anti-Sense RNAs of Cucumber Mosaic Virus in Transgenic Plants Assessed for Control of the Virus”, Plant Molecular Biology, 11巻, 463~471頁, 1988年; Rodermel等, “Nuclear-organellar Interactions: Nuclear Antisense Gene Inhibits Ribulose Biphosphate Carboxylase Enzyme Levels in Transformed Tobacco Plants”, Cell, 55巻, 673~681頁, 1988年; Smith等, “Antisense RNA Inhibition of Polygalacturonase Gene Expression in Transgenic Tomatoe

18

s”, Nature, 334巻, 724~726頁, 1988年; Van der Krol等, “An Anti-Sense Chalcone Synthase Gene in Transgenic Plants Inhibits Flower Pigmentation”, Nature, 333巻, 866~869頁, 1988年を参照)。この発明の形質転換されたタバコの細胞と植物内で、PMTを発現するのにCaMV 35Sプロモーターを用いることが好ましい。タバコの根の中で、他の組換え遺伝子を発現するためにCaMVプロモーターを用いることは充分に報告されている (Lam等, “Site-Specific Mutations Alter In Vitro Factor Binding and Change Promoter Expression Pattern in Transgenic Plants”, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 86巻, 7890~7894頁, 1989年; Poulsen等, “Dissection of 5' Upstream Sequences for selective Expression of the Nicotiana glauca 35S rbcS-8B Gene”, Mol. Gen. Genet., 214巻, 16~23頁, 1988年)。

【0082】CaMV 35Sプロモーターを使用する方が好ましいけれども、他のプロモーターがタバコ植物内に異種遺伝子を発現するのに成功裡に用いられることは明らかであり、CaMV 35Sプロモーター以外のプロモーターを使用することもこの発明の範囲に含まれる。

【0083】各種の転写終結配列が知られている。転写終結配列の起源と同一性は主として便宜上の問題である。例えば、ノバリンシンターゼ (“NOS”)、オクトピンシンターゼ (“OCS”) およびCaMVポリアダニル化/転写終結配列は、トランスジェニックタバコ植物中で異種の遺伝子を発現させるのに用いられ、PMT配列の発現に有用である (例えばRezaian等の前記文献およびRodermel等の前記文献を参照)。

【0084】次に、制限地図の作成、サザンブロット検定法、およびヌクレオチド配列分析法のような標準方法を使用して、アンチセンス配向でPMT配列を有し、調節配列(すなわちプロモーターと、ポリアダニル化/転写終結配列)に作動可能に連結されているクローンを同定する。

【0085】外因性DNAで安定に形質転換されたトランスジェニック細胞を製造するために、タバコ細胞のゲノムに外因性DNAを導入するのに適用できるよく発達した方法がある。多数の公知の、タバコ細胞形質転換法のいずれかを、この発明を実施するのに使用できる。タバコ細胞の形質転換法は、アグロバクテリウム (Agrobacterium) 系の成分を用いるか否かに基づいて簡便に分類される。

【0086】アグロバクテリウム・ツメファシエンシ (Agrobacterium tumefaciens) は、“T-DNA” (転移されたDNAとして) と呼ばれるヌクレオチド配列を有するプラスミドを有し、かつ天然の双子葉植物 (タバコを含む) の染色体に効率的に転移され組み込まれ、感染した植物に腫瘍を成長させるグラム陰性菌であ

(11)

特開平5-84075

19

る。異種のDNAを植物の染色体に組込むための天然産物のベクター系は、植物の遺伝子工学で、広く研究され、変性され、開発されている(Deblaere等, "Efficient tobacco Ti Plasmid-Derived Vectors for Agrobacterium-Mediated Gene Transfer to Plants", *Nucleic Acids Research*, 13巻, 4777~4788頁, 1985年)。調節配列に対しセンス配向もしくはアンチセンス配向で作動可能に連結されたPMT DNA配列を含有する挿入DNA分子を、適当なT-DNA配列に通常の方法によって接続する。これらを、ポリエチレングリコール法または電気穿孔法によって(両法とも標準の方法)、タバコの原形質体中に導入される。あるいはPMTをコードする挿入DNA分子を含有するかようなベクターを、生アグロバクテリウム細胞に導入する。次いでこの細胞がそのDNAをタバコ植物細胞に転移させる(Rogers等, "Gene Transfer in Plants: Production of Transformed Plants Using Ti Plasmid Vectors", *Methods in Enzymology*, 118巻, 827~840頁, 1986年)。

[0087]アグロバクテリウム法は当該技術分野では広く用いられているが、この発明の方法では必要要素ではない。T-DNAベクター配列をもっていない挿入DNAによる形質転換は、タバコ原形質体をDNA含有リポソームと融合させるかまたは電気穿孔法によって行うことができる(Shillito等, "Direct Gene Transfer to Protoplasts of Dicotyledonous and Monocotyledonous Plants by a Number of Methods, Including Electroporation", *Methods in Enzymology*, 153巻, 313~318頁, 1987年)。T-DNAベクター配列をもっていない挿入DNAも、不活性高速マイクロブジェクティル[BIOLOGIC (登録商標) Particle Delivery System, Dupont, 米国, デラウェア州, ウイルミントン]によって、タバコ細胞を形質転換するのに用いることができる。

[0088]この発明の形質転換されたタバコ細胞とタバコ植物を作製するのに使用されるPMT挿入DNA分子とベクターは、さらに、優性の選択マーカー遺伝子を含有する方が好ましい。タバコに用いるのに適切な優性の選択マーカーには、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼおよびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼをコードする抗生物質耐性遺伝子が含まれる。タバコに用いるのに適切な、その他の公知の優先の選択マーカーは、メトトレキサート耐性ジヒドロ葉酸レダクターゼをコードする変異体のジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子である(Deblaere等の前記文献)。適切な抗生物質耐性遺伝子を含有するDNAベクターおよび対応する抗生物質は市販されている。

[0089]形質転換されたタバコ細胞は、選択された優性の選択マーカー遺伝子の産生物が耐性を与える抗生

20

物質(またはタバコ細胞に対して通常毒性の他の化合物)を適当な濃度で含有する培地に、細胞の混合集団を入れることによって、未形質転換細胞の周囲の集団から選択される。したがって、形質転換されたタバコ細胞だけが生存し増殖する。

[0090]形質転換された細胞は、当該技術分野で公知のタバコ細胞と組織の培養法を適用することによって、誘導されて、無傷で実りあるタバコ植物を再生する。植物再生方法は、形質転換法と整合するように選択される。推定のトランスジェニックタバコ植物のゲノム(genome)中にPMT配列が安定に存在して配向していることの検証は、PMTの配列のメンデルの遺伝によって行われ、制御された交雑によってもたらされる子孫に対して行われる標準のDNA分析によって明らかになる。

[0091]トランスジェニックタバコ植物を、形質転換された細胞から再生させた後、導入されたPMT配列は、通常の植物増殖法で余分の実験なしで他のタバコ交雑に容易に転移される。

[0092]PMTアンチセンストランスジェニックタバコ植物の減少したレベルのニコチンは標準のニコチン検定法で検定される。

[0093]上記の挿入DNA法を知っていれば、全長のPMT cDNA分子または全長のPMT染色体遺伝子を用いて、適当な作動可能に連結された調節配列をセンス配向で連結させて、トランスジェニックタバコ細胞とトランスジェニックタバコ植物を構築することができる(また当該技術分野の熟練者は、センス配向で遺伝子を発現する適当な調節配列が、上記のプロモーターとポリアダニル化/転写終結配列に加えて、公知の真核翻訳開始配列のいずれか一つを含んでいると分かるであろう)。このような形質転換されたタバコ植物は、PMTタンパク質のレベルが増大し、したがって未形質転換の対照のタバコ植物よりニコチン含有が高いことが特徴である。

[0094]それ故に、PMT DNA配列を用いて、PMTタンパク質のレベルを減少させるかまたは増加させて、タバコ植物中のニコチン含量を減少させるかまたは増加させることがこの発明の範囲に含まれることは理解すべきである。

[0095]この発明を一層よく理解するために以下に実施例を示す。これらの実施例は例示することだけを目的とするもので、この発明の範囲を限定するものではない。

[0096]実施例

緩衝液の組成

緩衝液A

50 mMのトリス/HCl, pH 7.5

5 mMのEDTA (遊離酸)

2.0% (V/V) のグリセリン

(12)

特開平5-84075

21

2 mMのDTT

0.5% (W/V) のアスコルビン酸ナトリウム

2% (W/V) のPEG400

0.4 mg/mlのPMSF (1 mg/mlの貯蔵溶液由来)

0.4 mg/mlのロイペプチン (1 mg/mlの貯蔵溶液由来)

100 g/mlのPVPP

40 g/mlのアンバーライトXAD-4

緩衝液B

10 mMのトリス/HCl, pH 7.5

1 mMのEDTA (遊離酸)

20% (V/V) のグリセリン

2 mMのDTT

0.4 mg/mlのPMSF (1 mg/mlの貯蔵溶液由来)

0.4 mg/mlのロイペプチン (1 mg/mlの貯蔵溶液由来)

緩衝液C

10 mMのトリス/HCl, pH 7.5

1 mMのEDTA (遊離酸)

20% (V/V) のグリセリン

2 mMのDTT

[0097] プロテアーゼ阻害剤の貯蔵溶液

PMSF (1 mg/ml) をジメチルホルムアミドに溶解し、2.1 mlずつを、使用するまで-20℃で貯蔵した。ロイペプチン (1 mg/ml) を蒸留水に溶解し、2.1 mlずつを、使用するまで-20℃で貯蔵した。

[0098] 粗製抽出液の製造

水耕栽培法で栽培したタバコ (ニコチアナ・タバクム L. var. パレイ21) 植物の根の約1 Kgを、摘花してから3日後に収穫した。収穫した根を冷水で洗浄し、フナー漏斗に入れて水を吸引して除去した。洗浄した根を-80℃に冷凍して貯蔵した。冷凍した根を、1 ガロンワーリングブレンダー中で予め冷却してスラリーにしておいた2.5 lの緩衝液に添加した。根を大きなスプーンで緩衝液スラリーと混合した。ブレンダーを低速設定で運転を開始し、次に中速度設定でホモゲナイゼーションを行った。ホモジネートの温度が3~5℃より高くならないように注意した。

[0099] 得られた抽出物を遠心分離びんに入れ、13680×gで70分間4℃で遠心分離して不溶性の破片をペレット化した。

[0100] 上澄み液をデカントしたがその容積は2.37 lであった。約0.77 gのDTTを抽出液に添加した。

[0101] 硫酸アンモニウムによる画分

硫酸アンモニウムの結晶を、抽出液100 ml当り2.8 gの量で抽出液に徐々に添加し、硫酸アンモニウ

22

ムで抽出液を40%飽和度にした。得られた硫酸アンモニウム含有抽出液を4℃で2時間攪拌した。

[0102] 40%飽和度の硫酸アンモニウムによる沈澱を、27500×gで30分間4℃にて遠心分離することによって取出した。抽出液1 l当り0.33 gの追加のDTTを添加した。硫酸アンモニウムの結晶を、抽出液100 ml当り15.3 gの量で抽出液に徐々に添加して、硫酸アンモニウムの濃度を40%飽和度から65%飽和度まで増大させた。65%飽和度の硫酸アンモニウム含有の抽出液を一俵4℃で攪拌した。40~65%飽和度の硫酸アンモニウムによる画分を、27500×gで70分間4℃にて遠心分離することによってペレット化し、上澄み液を廃棄した。

[0103] 40~65%飽和度の硫酸アンモニウムによる沈澱を緩衝液Bに溶解して全容積を200 mlにし、次に17.53 gのNaClを添加し、氷上で攪拌して溶解させた。NaClを添加した40~65%画分の溶液を47800×gで30分間、4℃で遠心分離し、生成したペレットを廃棄した。

[0104] 粗製抽出液の製造と硫酸アンモニウムによる画分を、先に述べたのと実質的に同じようにしてさらに3回実施し、得られた四つの40~65%飽和度硫酸アンモニウム画分 (各々200 ml) をブールした。このようにして製造した800 mlのブールは合計5.239 Kgの根の組織に相当するものであった。

[0105] 疎水性相互作用クロマトグラフィー

フェニルセファロースCL4B (Pharmacia Inc., 米国、ニュージャージー州、ヒスカウエイ、カタログ番号: 17-0810-01) 疎水性相互作用カラム (5 cm×20 cm) を、1.5 M NaClを補充した緩衝液Cで平衡化した。5.239 Kgの根の組織に相当する、800 mlのブールの透明な40~65%飽和度硫酸アンモニウム画分を、上記の平衡化したフェニルセファロースカラムに注入した。280 nm波長光の吸光度の安定したベースラインが得られるまで (未結合のタンパク質がすべて除去されたことを示す)、カラムを、1.5 M NaClを補充した緩衝液Cで洗浄した。次に、緩衝液C中1.5 Mから0.0 Mまで濃度が低下するNaClの線状勾配液2 lでPMTを洗離した。追加の緩衝液C 1 lでさらにカラムを洗浄した。各々12 mlずつの画分を収集し、画分を (PMT活性がピーク時およびその前後では3画分毎に、その他の勾配液の画分では10画分毎に)、つぎのようにしてPMT活性を連続して検定した。疎水性相互作用クロマトグラフィーを、4℃にて4.7 ml/minの流速で実施した。

[0106] PMT活性を有するフェニルセファロース画分#86~#118をブールし、得られたブールを絶えず攪拌しながら、8 lの緩衝液Cに対して約18時間透析した。透析された試料を100 mlずつの四つの部分に分けて-80℃に冷却した。

(13)

特開平5-84075

23

24

[0107]

PMT活性の検定

各反応管に以下のものを入れた。

12.5nmol トリス/HCl 8.3

0.25nmol EDTA

1.25nmol 2-メルカプトエタノール

0.8nmol ブトレッシン

0.15nmol 未標識S-アデノシルメチオニン

0.18nmol [¹⁴C-メチル] S-アデノシルメチオニン
(57nCi/nmol)

酵素試料

合計容積=0.25ml

[0108] 反応は酵素試料を添加することによって開始され、30℃にて30分間行った。NaClで飽和した10% (W/V) NaOH溶液0.5mlを添加することによって反応を停止させた。

[0109] 放射性生成物、N-[¹⁴C-メチル] ブトレッシンを、クロロホルムへの溶媒抽出によって、基質から分離した。反応を停止させた混合物を1mlのクロロホルムとともに90秒間旋回攪拌した後、1600×gで5分間遠心分離して有機相と水相に分離させた。次に、有機相の0.5mlを検定した。0.5mlの有機相を9.5mlの液体シンチレーションカクテル (Beckman Instruments, 米国、メリーランド州、コロンビア) に添加し、放射能を液体シンチレーションカウンターを用い標準の方法で測定した。

[0110] PMT活性の1単位は、30℃にて30分間に生成する生成物の1ナノモルと定義する。

[0111] 負の対照はすべての検定に含まれている。負の対照は、酵素なしの反応混合物、または時間零の時点でNaOHで反応を停止させた混合物で構成されている。

[0112] アニオン交換クロマトグラフィ
フェニルセファロースで精製した100mlずつの二つの試料を溶解し、次いで、4℃にて緩衝液Cで平衡化したDEAE-セファロース "Fast Flow" カラム (Pharmacia-LKB, 米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ、カタログ番号: 17-0709-01, ロット番号: OB-05854, 1cm×14.5cm) に、4℃にて、1.5ml/minの流速で注入した。

[0113] 次にDEAE-セファロースカラムを、安定した280nmのベースラインが得られるまで、10mM NaClを含有する緩衝液C 70mlを用い、1.5ml/minの流速で洗浄した。次にこのカラムを、NaClなしの緩衝液Cの50mlで再び平衡化した。次にカラムの温度を室温 (24℃) まで上昇させ、カラムの空腔容量を、5mMブトレッシン (Sigma Chemical Co., 米国、ミズリー州、セントルイス、カタログ番号: P7505, ロット番号: 39F0039) を含有緩衝液Cで置換した。カラムを24℃で約1時間、何も通過させず

に保持し、次いで5mMブトレッシン含有緩衝液C 832mlを用いて0.7ml/min (15時間) の流速で24℃にてPMTを溶離した。

[0114] 吸着によるPMTの濃縮

DEAE-セファロースカラムから溶出させたPMTを、ω-アミノヘキシルセファロース4B ("AH S") (Sigma Chemical Co., 米国、ミズリー州、セントルイス、カタログ番号: A8884) のカラム (1cm×3cm) (4℃に保存した) に直接集めた。PMTを、上記AHSカラムから、1.5M NaClを含有する緩衝液Cを用いて1.6ml/minの流速で溶離した。12~15mlずつの四つの画分を収集し、上記のようにしてPMT活性を検定した。最初の画分 (14.7ml) が、AHS濃縮カラムから回収された全PMT活性の80%以上を含有していた。

[0115] 限外濾過

さらに濃縮するために、13.7mlの最初のAHS画分を六つの部分に分けて、"Centricon 30" (Amicon, 米国、マサチューセッツ州、デンバーズ) 限外濾過装置に入れて約25倍に濃縮した。6台の上記装置からの濃縮液をプールし、塩を添加していない緩衝液Cで約80倍に希釈し、単一の "Centricon 30" を用いて、全容積が約150μlになるまで第2回の限外濾過を行った。得られた150μlの濃縮液を-80℃で貯蔵した。

[0116] 分取等電点焦点化電気泳動

DEAE/AHS工程 (限外濾過法による濃縮を含む) で精製したPMTを、等電点焦点化電気泳動法でさらに精製した。分取規模の等電点焦点化電気泳動法を、スクロース密度勾配液中 (1.9cm×21cm) で市販の両性電解質 (Pharmacia-LKB, 米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ) を使って実施した。pH勾配液は両性電解質の販売者の説明書にしたがって作製し、pHの範囲を約5.3~約6.3とした。1000~4000ボルトの電圧を印加して (1~4ワットの電力)、約3時間焦点化を行った。焦点化を行った後、1mlずつの画分を集め、各画分のpHとPMTの活性を測定し

25

(14)

特開平5-84075

26

た。焦点化と画分の収集は4℃で行った。

【0117】図4は、等電点焦点化電気泳動を行った後の、PMT相対活性とpH対画分番号（すなわちスクロース密度勾配の位置）の双対グラフである。図4に示す実験データは、タバコPMTの等電点が約5.7であることを示している。他の等電点焦点化電気泳動の実験では、タバコPMTのPIは、5.0という低い値と5.8という高い値を示すようである。実際には、多くの因子が見掛けのPIに影響して、PIの測定値は通常いく*

* ちか変動することは、当該技術分野の熟練者ならは分かるであろう。

【0118】精製工程の連続した段階におけるPMTの相対純度を比活性の測定値で評価した（表1）。表1に示す精製度値（倍）は、タバコの根の粗製抽出液からの実際の精製度の過小評価値である。なぜならば40～85%飽和度硫酸アンモニウムによる画分を、活性収率を計算する際に100%としているからである。

【0119】

1

表

工程の段階	全タンパク質 (mg)	比 活 性 (単位/mg)	活性収率 (%)	精製度 (倍)
硫酸アンモニウム	4128	47.9	100.0	1.0
フェニルセファロース	680	134.6	46.3	2.8
DEAE/AHS	1.76*	5203	7.7*	108.6

・四つの別個の粗製抽出液由来の40～85%飽和度硫酸アンモニウムによる画分のプール。

** フェニルセファロースカラム由来の物質の1/2だけを示す。

【0120】また、この発明の方法の連続した段階におけるPMTの相対純度を、標準のSDS-PAGE法で測定した。図1は、PMT精製工程の各段階において試料が（銀染色時に）示すSDS-PAGEタンパク質バンドパターンを示す。ゲル上の試料は次のとおりである。レーン1と8：分子量標準タンパク質（後記の図面の簡単な説明の欄に列挙した）；レーン2：40～85%飽和度硫酸アンモニウムによる画分；レーン3：フェニルセファロースカラム由来のPMT活性がピークの画分；レーン4：DEAE/AHS段階由来の濃縮物質；レーン5：DEAE/AHS段階由来の濃縮物質を等電点焦点化電気泳動させたもののPMT活性がピークの画分。DEAE/AHSで精製された物質（レーン4）で支配的なPMTバンド（矢印で示す）が、前出の疎水性相互作用の段階由来の物質（レーン3）中ではほとんど見取れないことが分かる。

【0121】タバコPMTの分子量

タバコPMTの見掛けの分子量を、硫酸アンモニウム、フェニルセファロース、およびDEAE-AHS/限外濾過の精製段階を通過したPMT物質を注入した非変性の電気泳動ゲル上でPMTを単離した実験で測定した。非変性濃縮用ゲルの緩衝液は、0.27Mトリス/HCl (pH 6.8)、10% (V/V) グリセリンおよび20mMの2-メルカプトエタノールを含有していた。非変性12.5%ポリアクリルアミド分離用ゲル緩衝液は0.38Mトリス/HCl (pH 8.8)、10% (V/V) グリセリン、および12mMの2-メルカプトエタノールを含有していた。

【0122】非変性ゲル由来の単一のレーンを切り取り、長さ方向に1/2に切断し、次いで3mm厚のスライスに切断した。各ゲルスライスの1/2を、標準のPMT検定混合物に直接入れ、各ゲルスライスの対応する1/2をSDS-PAGEに付した。

【0123】最高のPMT活性を示した非変性ゲルスライス（図2）は、特に、見掛けの分子量が約60KDの単一タンパク質を含有していた（図3）。

【0124】PMTの酵素活性

基質特異性試験を、この発明の高度に精製したタバコPMTについて行った。1, 3-ジアミノプロパンと1, 5-ジアミノペンタン（いずれもブトレッシンの化学的類似体）、ホスファチジルエタノールアミン（メチル基受容体）およびN-メチルブトレッシン（PMTの通常の産生物）をPMTに対する基質として働く性能について、ブトレッシン（1, 4-ジアミノブタン）と比較した。1, 3-ジアミノプロパン、1, 5-ジアミノペンタンおよびホスファチジルエタノールアミンを、標準のPMT検定法（上記の検定法）でブトレッシンの代わりに用いた場合、検出可能な量の放射性産物は生成しなかった。PMTの検定に、N-メチルブトレッシンをブトレッシンの代わりに用いた場合、放射性産物の生成は、ブトレッシンで観察したときの8%以下であった。

【0125】二つのPMTの基質、すなわちブトレッシンとS-アデノシルメチオニンの見掛けのKm値を他の基質を過剰に存在させながら、一つの基質の各種の濃度で（上記のようにして）PMT活性を測定することによって決定した。高度に精製したタバコPMTのブトレッシンについてのKmは約400μMであった。高度に精製したタバコPMTのS-アデノシルメチオニンについてのKmは約125μMであった。軽度に精製されたタバコPMTによってブトレッシンについて見出され

(15)

特開平5-84076

27

28

たKm値と、高度に精製されたタバコPMTKによってS-アデノシルメチオニンについて見出されたKm値は、PMTについて発表された値とよく一致している (Mizusaki等の前記文献; Feth等, "Determination of Putrescine N-methyltransferase By High Performance Liquid Chromatography", Phytochemistry, 24巻, 921~923頁, 1985年)。

[0128] アミノ末端アミノ酸配列の分析

配列分析用のタバコPMTは、硫酸アンモニウムによる分画、フェニルセファロースクロマトグラフィ、ブトレーションで溶離するDEAEセファロースクロマトグラフィ (次いでAHSと膜外濾過で濃縮を行う)、およびフリーフロー等電点焦点化電気泳動法の精製工程にかけた物質を、SDS-PAGE法に付することによって単離した。高度に精製したPMTをSDS-PAGEに付した後、得られたタンパク質のバンドをポリニブ化ビニリデンの膜 ("Immobilon", Millipore, 米国, マサチューセッツ州, ベッドフォード) 上にエレクトロブロットを行い、次いでアミドブラックを用い、標準方法で視覚化した。"a1" バンド (図5参照) を有する膜片は、タバコPMTの分子量特性を示す高度に精製された製剤の二つだけのバンド (図3参照) の一つであるが、これを、隣接する"a2" バンドをさけて切取った。このようにして単離したPMTについて、メーカーが推薦する方法にしたがって、オンライン120A分析計 (パルス液相シーケンサー) を備えたApplied Biosystems 477A型を用いてアミノ末端アミノ酸配列分析を行った。

[0127] タバコPMTの"a1" バンドのアミノ末端における最初の17のアミノ酸の配列は、(配列番号 30 1): Leu Ser Xaa Asn PheLeu*

(i) 配列:

```

Leu Ser Xaa Asn Phe Leu Phe Gly Thr
1           5
Ala Ser Ser Xaa Tyr Gln Tyr Glu
10          15

```

(2) 配列番号: 2

(i) 配列の特性:

(A) 長さ: 17アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(i) 配列:

```

Leu Ser Ser Asn Phe Leu Phe Gly Thr
1           5
Ala Ala Pro Tyr Tyr Gln Tyr Glu
10          15

```

(3) 配列番号: 3

(i) 配列の特性:

(A) 長さ: 17アミノ酸

*Phe Gly Thr Ala Ser Ser Xaa Tyr Gln

Tyr Gluであることが分かった。

[0128] "a2" バンド (図5参照) は、タバコPMTの分子量を示す二つだけのバンドの2番目のものであった (図3参照)。
"a2" バンド (図5) を作り "a1" バンドと同様に分析したところ、"a2" バンドは、以下の部分アミノ酸配列 (配列番号2): Leu Ser Ser Asn Phe Leu Phe Gly Thr Ala Ala Pro Tyr Tyr Gln Tyr Gluを生成した。

[0129] この発明のいくつかの態様を説明してきたが、基本的な構造を変えてこの発明の方法と生成物を利用する他の態様を提供することができることは明らかである。それ故に、この発明の範囲は、実施例として示した特定の態様ではなく特許請求の範囲によって定義されるべきであることが分かる。

[0130] 配列表

(i) 配列番号: 1

(i) 配列の特性:

(A) 長さ: 17アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(iii) ハイボセチカル: N

(v) フラグメント型: N末端フラグメント

(vi) 起源:

(A) 生物名: ニコチアナ・タバタム

(B) 株名: パーレイ21

(F) 組織の種類: 根

※ (iii) ハイボセチカル: N

(v) フラグメント型: N末端フラグメント

(vi) 起源:

40 (A) 生物名: ニコチアナ・タバタム

(B) 株名: パーレイ21

※ (F) 組織の種類: 根

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

50 (ii) 配列の種類: タンパク質

(36)

特開平5-84075

29

30

(iii) ハイボセティカル: N

* (A) 生物名: ニコチアナ・タバタム

(iv) フラグメント型: N末端フラグメント

(B) 株名: パーレイ21

(vi) 起源:

* (C) 組織の種類: 根

(xi) 配列:

Leu	Ser	Xaa	Asn	Phe	Leu	Phe	Gly	Thr
1				5				
Ala	Xaa	Xaa	Xaa	Tyr	Gln	Tyr	Glu	
10					15			

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、タバコPMTの精製工程の連続段階で得られたタンパク質のパターンを示す。銀染色12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルの写真の複写物である。レーン1と6: 分子量基準タンパク質 (ホスホリラーゼB, 95.5KD; グルタミン酸デヒドロゲナーゼ, 55.0KD; オボアルブミン, 43.0KD; 乳酸脱ヒドロゲナーゼ, 35.0KD; カルボニックアンヒドラーゼ, 29.0KD; ラクトグロブリン, 18.4KD; シトクロムC, 12.4KD)。レーン2: 40~65%飽和硫酸アンモニウム画分。レーン3: 疎水性相互作用カラム由来のPMT活性ピーク画分。レーン4: アニオン交換カラムからブトレッショで溶離して濃縮した物質。レーン5: アニオン交換カラム由来の濃縮物質のフリーフロー等電点電気泳動によって得られたPMT活性ピーク画分。

【図2】図2は、12.5%非変性ポリアクリルアミドゲル由来の3mm厚連続スライスのPMT活性を示すグラフであり、そのゲルには、アニオン交換カラムからブトレッショで溶離して濃縮した物質をロードした。PMTの酵素活性は、生成物として回収された¹⁴C増変数/分 (バックグラウンド上) として表現し、"相対活性" と命名してある。

【図3】図3は、非変性電気泳動ゲルのPMT活性のバンドおよびその前後の3mm厚連続スライス (図2) が純度と見掛けの分子量について分析された。銀染色12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルの写真の複写※

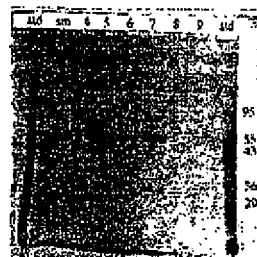
※物である。"Sm" と命名されているレーンは出発物質 (すなわち非変性ゲルに添加された物質) を含有している。"Sld" と命名したレーンは、分子量基準タンパク質 (ホスホリラーゼB, 95.5KD; グルタミン酸デヒドロゲナーゼ, 55.0KD; オボアルブミン, 43.0KD; 乳酸脱ヒドロゲナーゼ, 35.0KD; カルボニックアンヒドラーゼ, 29.0KD; ラクトグロブリン, 18.4KD; シトクロムC, 12.4KD) を含有している。

【図4】図4は、硫酸アンモニウム分画法、疎水性相互作用クロマトグラフィ、およびアニオン交換カラムからのブトレッショによる溶離に続いて試料を濃縮することによって精製したタバコPMTを等電点電気泳動させることによって得られた画分の相対PMT活性とpHを画くグラフである。PMTの酵素活性は、生成物として回収された¹⁴C増変数/分 (バックグラウンド上) として表現し、"相対活性" と命名してある。

【図5】図5は、(不活性画にエレクトロブロットした後) 切り取り、アミノ酸配列の決定を行ったPMTタンパク質バンド ("a1" と "a2") を示す銀染色12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルの写真の複写物である。ゲルにロードした試料は、アニオン交換カラムからブトレッショで溶離された物質を等電点電気泳動させて得た画分の一部である。配列分析に用いられた実際のバンドは、図5のゲルで分析されたのと同じ物質の一部をロードした別個の (しかし同じ) ポリアクリルアミドゲル由来のものである。

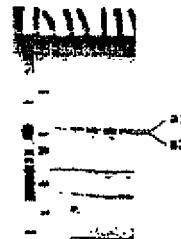
【図3】

FIG. 3



【図5】

FIG. 5

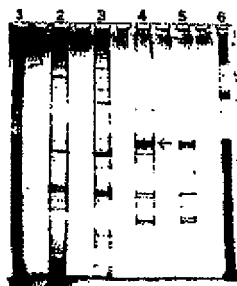


(17)

特開平5-84075

〔図1〕

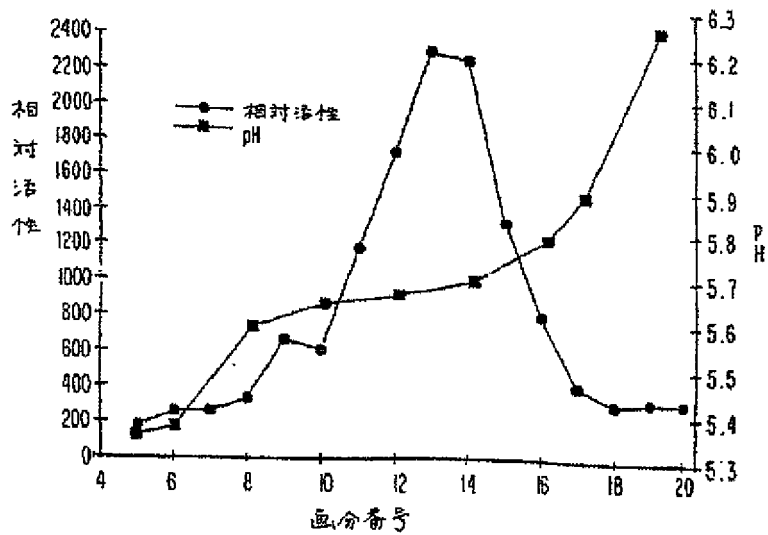
FIG. 1



〔図4〕

FIG. 4

PMT=等電点焦点化電気泳動

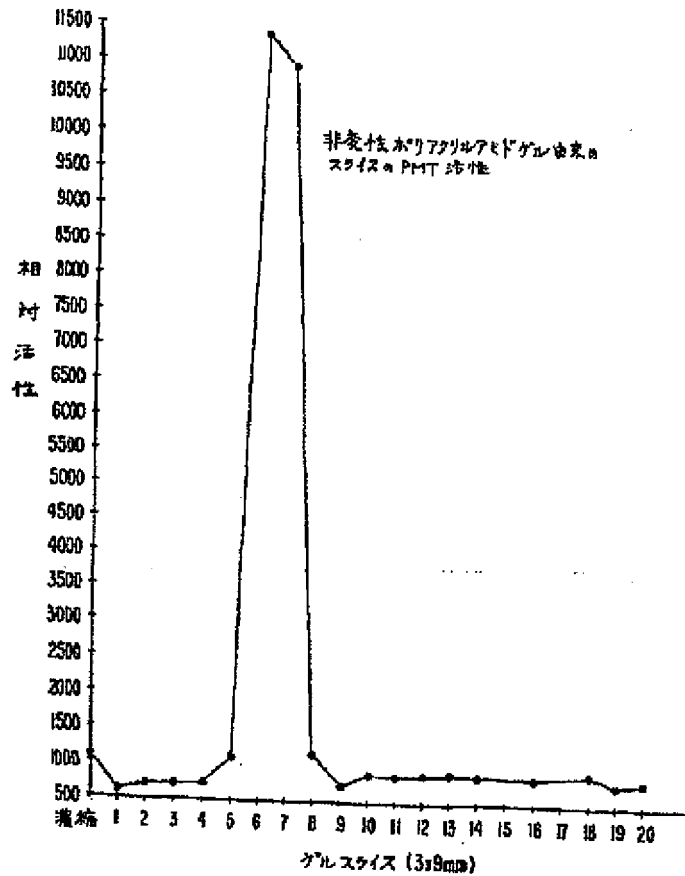


(18)

特開平5-84075

【図2】

FIG. 2



【手続補正書】

【提出日】平成3年12月6日

【手続補正1】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図1

【補正方法】変更

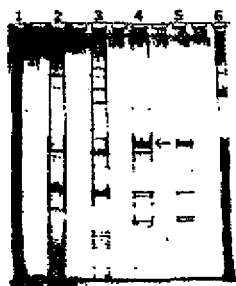
【補正内容】

【図1】

(29)

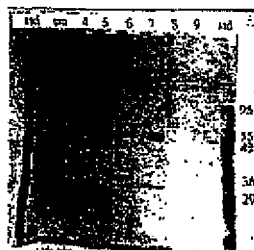
特開平5-84075

FIG. 1



【手続補正2】
【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】図3
【補正方法】変更
【補正内容】
【図3】

FIG. 3



*

*【手続補正3】
【補正対象書類名】図面
【補正対象項目名】図5
【補正方法】変更
【補正内容】
【図5】

FIG. 5



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁷ 識別記号 庁内整理番号 F1
C12N 5/10
15/11
15/34
//C12N 9/10
C12R 1:21

技術表示箇所

(72)発明者 ヴェドバル・エス・フリク
アメリカ合衆国ヴァージニア州23236、リ
ンチモンズ、デューベリイ、ドライヴ
2714